苏芸金杆菌广谱杀虫 Tm13-14 菌株晶体毒素及毒力特性*

阎冰 罗绍彬 阎建平 王惠杰
(中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

摘要 以新筛选的对鞘翅目、鳞翅目、双翅目均具毒性的 B.t. Tm13-14 菌株为材料，用 HD-1、3370-1 为参考菌株，比较了伴孢晶体蛋白的多肽组成，以及经三种昆虫肠道酶降解产生的抗酶多肽组分。SDS-PAGE 分析表明：Tm13-14 晶体蛋白含 138kD、132kD 主要成分和 65kD 次要成分。其晶体分别由三种昆虫肠道酶消化产生的毒性多肽，经生物测定，杀家蚕的毒性成分为 68.5kD、59kD 多肽；杀斜纹夜蛾毒性成分为 71kD、67kD 和 59.6kD 多肽；杀马铃薯瓢虫毒性成分为 69kD、65kD 多肽。它与 HD-1、3370-1 晶体均有明显差异。

关键词 苏芸金杆菌 Tm13-14，伴孢晶体，毒性多肽

苏芸金杆菌（*Bacillus thuringiensis*, B.t.）对大部分鳞翅目幼虫有较高的毒性，是目前应用最广泛的微生物杀虫剂之一。1977 年 Goldberg 等[1]分离到的一株对双翅目蚊幼虫有特异敏感性的 ONR-60A(1897)菌株，开阔了人们对 B.t. 杀虫谱的认识。1982 年德国学者又分离到 B.t. subsp. tenebrionis 菌株[2]，对数种鞘翅目幼虫显示毒性，但对鳞翅目和双翅目幼虫无毒。1990 年罗绍彬等[3]从黄粉虫 *Tenebrio molitor* 死亡幼虫尸体中分离到一株编号为 Tm13-14 的 B.t. 菌株，不仅对鞘翅目的马铃薯瓢虫 *Epilachna niponica* 有毒性，而且还对鳞翅目、双翅目的某些幼虫显示出毒性，它有别于目前已报道的 B.t. 菌株。本文以 Tm13-14 菌株为材料，研究了其晶体毒素的成分及其毒力特性，试图了解 B.t. 广谱杀虫菌的物质基础，以便为选育特异性广谱菌提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

（1）菌株：苏芸金杆菌三个菌株。Tm13-14，本室分离；HD-1，本室保藏；3370-1，本室分离，暂定为大理亚种，迄今尚未发现敏感虫种。

（2）供试昆虫：家蚕（*Bombyx mori*），斜纹夜蛾（*Spodoptera litura*），马铃薯瓢虫（*Epilachna niponica*）。

1.2 方法

（1）伴孢晶体的提纯：依照 Pendleton 和 Morrison（1966）等[4]的液体双相法。晶体纯度为 98% 以上。3370-1 培养至完全成熟时晶体仍不脱落，加 1/3(*V*/*V*)Tm13-14

* 国家自然科学基金和国家 85-10-02 课题资助项目。
本文于 1993 年 1 月收到。

肉汤，培养到 40% 孢晶分离时之上清液(超滤除菌后)，继续培养 8—12 h，晶体脱落，再按双相法提纯。

(2) 蛋白质浓度测定：用紫外光吸收法[5]，牛血清白蛋白做标准。

(3) 昆虫肠道酶粗提物制备：参照沙槎云方法[6]。轻压 5 龄家蚕、5 龄斜纹夜蛾、4 龄马铃薯瓢虫的腹部，收集返吐液于冰浴容器中，10000r/min 4℃ 离心 10 min，收集上清液置 −20℃ 冰箱保存备用。

(4) 酶活力测定：参照 Tojo[7] 等方法，并加以改进。100μl 昆虫肠道酶粗提物于 1ml 0.1 mol/L gly-NaOH 缓冲液 (pH 10.02) 中，加 1ml 1%(*W*/*V*) 酪蛋白于上述缓冲液，27℃ 温育 20 min，加 1ml 10% 三氯乙酸终止酶反应，5000r/min 离心 6 min，取上清液测 OD_{280} 值。酶活力以单位/毫升表示。在本实验中，一个单位 (U) 规定为在上述条件下每分钟 OD_{280} 值增加 1。

(5) 晶体蛋白质成分分析：参照 Li 等[8]方法，伴孢晶体以 0.1mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0)，25mmol/L 二硫苏糖醇，1% SDS，100℃ 3 min 溶解，SDS-PAGE 分析。

(6) 晶体的昆虫肠道酶消化：参照 Yawetz 等[9]方法。

(7) SDS-PAGE：参照 Weber 等[10]和莽克强[11]方法。上层胶 4%，下层胶 10%。凝胶大小为 90 × 120 × 1.5mm，15—20 mA 稳流电泳。

(8) Tm13-14 毒性肽的提纯和鉴定：参照沙槎云等[6]方法。

(9) 生物测定：2 龄家蚕饲喂桑叶；2 龄斜纹夜蛾饲喂蓖麻叶或包菜叶；龄期 3—4 天的马铃薯瓢虫饲喂龙葵或马铃薯叶。用一定浓度的晶体悬液或经纯化的毒性肽 (加 0.001% 吐温 80) 均匀涂布于叶片两面。每一处理放 25 头幼虫，在 26℃—27℃下温育。无菌蒸馏水为对照，经 1—7 天观察并统计死亡率。

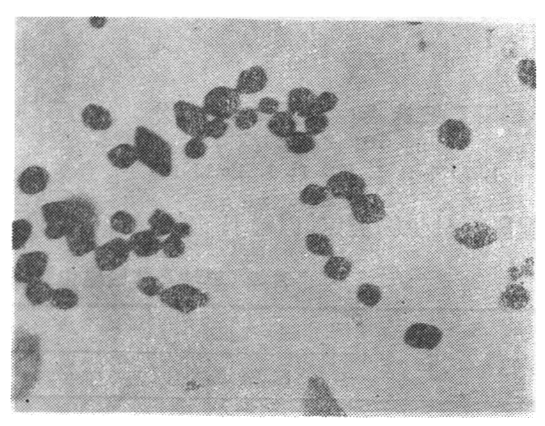


图 1　Tm13-14 晶体　×5500

2　结果

2.1　Tm13-14 晶体的形态

Tm13-14 晶体有球形、不规则形，亦有方形和棱形(图1)。

表 1　三株 B.t. 晶体蛋白的多肽组成

菌　株	主 要 成 分	次 要 成 分
3370-1	138000	100000,63000,60500　51500,53200
HD-1	130000	65000
Tm13-14	138000,132000	65000

2.2 晶体蛋白质成分

Tm13-14 晶体由 138、132kD 主要成分和 65kD 次要成分组成。与 HD-1、3370-1 相比较，既有部分相同的组分又有明显的差异。结果见表 1 和图 2。

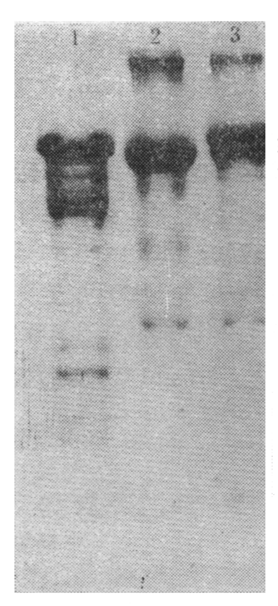


图 2 三株 B.t. 晶体蛋白质成分的 SDS-PAGE 图谱
1. 3370-1; 2. HD-1; 3. Tm13-14。

2.3 晶体蛋白的抗酶多肽 (PRPs)

Tm13-14、HD-1、3370-1 三种晶体分别经家蚕肠道酶 (0.00705U/ml)、斜纹夜蛾肠道酶 (0.00411U/ml)、马铃薯瓢虫肠道酶 (0.00315U/ml) 消化后产生不同的多肽图谱 (表 2，图 3)。Tm13-14 与 HD-1 相比较，经每种昆虫肠道酶消化后，HD-1 仅产生一种主要 PRP，而 Tm13-14 有 2 种以上；经家蚕或斜纹夜蛾肠道酶消化后，Tm13-14 均有与 HD-1 相同分子量的主要 PRP。3370-1 则较为特别，经斜纹夜蛾及马铃薯瓢虫肠道酶消化后仅产生分子量较低 (小于 16000) 的主要 PRP。Tm13-14 晶体经不同的昆虫肠道酶消化后亦产生不同的多肽图谱。

2.4 Tm13-14 毒性肽的初步提纯和鉴定

(1) Tm13-14 晶体经家蚕肠道酶消化产物，经 Sephadex G-100 柱层析，得 4 个洗脱峰。各洗脱峰经生物测定，以峰 II 毒性最高(表 3)，电泳显示为 68.5kD、59kD 多肽(图 4)。峰 II

表 2 三种晶体经昆虫肠道酶消化后的主要多肽成分

晶体	多肽成分		
	家蚕酶	斜纹夜蛾酶	马铃薯瓢虫酶
3370-1	71200, 5900 26000, 20600	10500	16000
HD-1	59000	67000	58300
Tm13-14	68500, 59000	71000, 67000 59600	98300, 94000 69000, 65000

表 3 Tm13-14 晶体经家蚕肠道酶消化后经 Sephadex G-100 和 DEAE-纤维素过柱各峰生测结果

死亡率(%)	Sephadex G-100 柱下 (10μg/ml)						DEAE-纤维素柱下 (10μg/ml)			
	时间(h)	I	II	III	IV	对照	对照	I′	II′	时间(h)
第一次	24	24	84	0	0	0	0	32	56	24
	48	76	100	4	0	0	0	100	100	48
第二次	24	20	72	4	0	0	0	40	64	24
	48	60	100	12	0	0	0	100	100	48

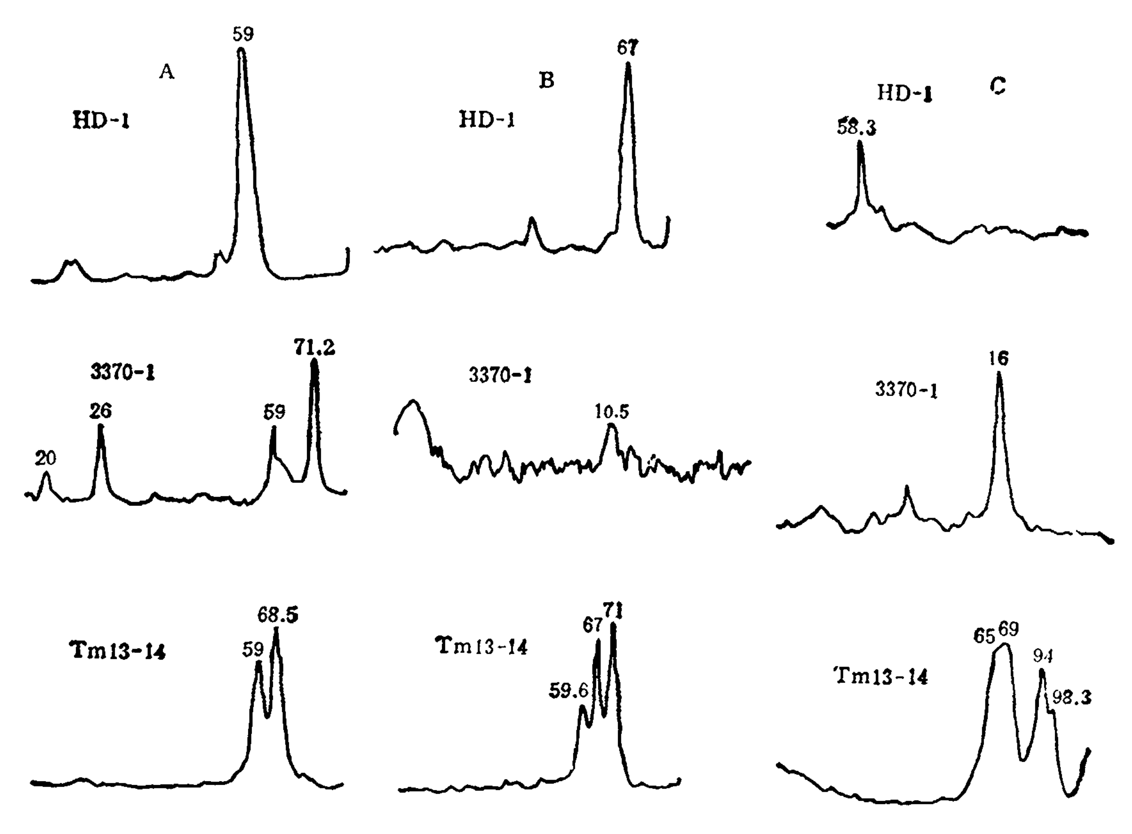


图 3　三种晶体经三种昆虫肠道酶消化后的 SDS-PAGE 凝胶扫描图

A. 家蚕；　B. 斜纹夜蛾；　C. 马铃薯瓢虫。

经DEAE-纤维素柱层析，得 2 个洗脱峰(图 7)，生测结果峰 I′、II′ 对家蚕均有毒性(表 3)。

(2) Tm13-14 晶体经斜纹夜蛾肠道酶消化后，经 Sephadex G-100 柱层析得 4 个洗脱峰。各洗脱峰进行生测，以峰 II 毒性最高(表 4)，电泳显示为 71kD、67kD、59.6kD (图 5)。峰 II 经 DEAE-纤维素柱层析，得 3 个洗脱峰(图 7)。生测结果表明，峰 I′、II′ 对斜纹夜蛾有毒性，峰 III′ 微毒或无毒(表 4)。

表 4　Tm13-14 晶体经斜纹夜蛾肠道酶消化后的 Sephadex G-100 和 DEAE-纤维素过柱各峰生测结果

死亡率 (%)	Sephadex G-100 柱下 (20μg/ml)						DEAE-纤维素柱下 (20μg/ml)			
	时间(h)	I	II	III	IV	对照	I′	II′	III′	对照
第一次	48	5.3	23.1	0	0	0	0	5	0	0
	72	68.4	84	33.3	0	0	33.3	60	11.8	0
第二次	48	5	24	0	0	0	5	7.14	0	0
	72	55	100	30	4	4	43.8	57.1	6.67	0

(3) Tm13-14 晶体经马铃薯瓢虫肠道酶消化后，经 Sephadex G-75 柱层析，得 2 个洗脱峰，经生物测定峰 I 有毒性(表 5)，电泳显示为 98.3kD、94kD、86.3kD、69kD、65kD 多肽(图 6)。峰 I 经 DEAE-纤维素柱层析，得 2 个洗脱峰(图 7)，生测表明峰 I′ 毒性较高，

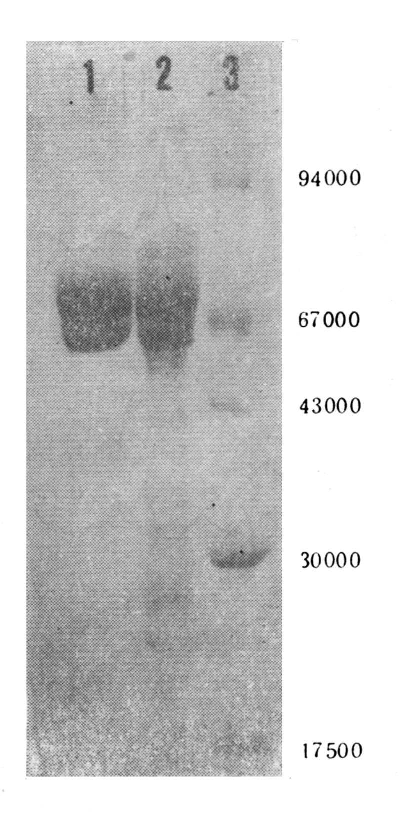


图 4 Tm13-14 晶体经家蚕肠道酶消化后 Sephadex G-100 柱下峰 II SDS-PAGE 图谱
1.峰 II；2.过柱前样品；3.标准分子量蛋白(磷酸化酶 B 94000，牛血清白蛋白 67000，肌动蛋白 43000，碳酸酐酶 30000，TMV 外壳蛋白 17500)。

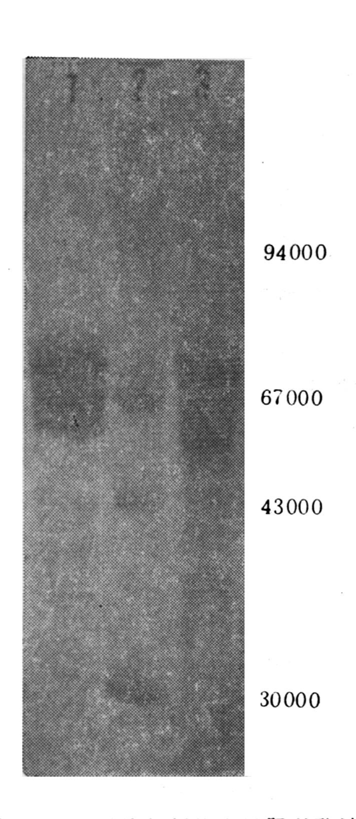


图 5 Tm13-14 晶体经斜纹夜蛾肠道酶消化后 Sephadex C-100 柱下峰 II SDS-PAGE 图谱
1.峰 II；2.标准分子量蛋白(见图 4 注释)；3.过柱前样品。

表 5 Tm13-14 晶体经马铃薯瓢虫肠道酶消化后 Sephadex G-75 和 DEAE-纤维素柱下各峰生测结果

死亡率(%)	Sephadex G-75 柱下 (100μg/ml)				DEAE-纤维素柱下 (50μg/ml)			
	时间(h)	I	II	对照	I′	II′	对照	时间(h)
第一次	27	48	0	0	68	8	0	48
	48	100	0	0	100	32	0	72
第二次	27	52	0	0	80	24	0	48
	48	100	0	0	100	36	0	72

电泳显示为 69kD、65kD 多肽，且 65kD 带比 69kD 带强。

2.5 Tm13-14 完整晶体及初步提纯毒性肽对马铃薯瓢虫毒力测定

用 Tm13-14 完整晶体、Sephadex G-75 柱下峰 I、DEAE-纤维素柱下峰 I′ 分别对 2 龄马铃薯瓢虫进行了毒力测定，结果见表 6。其 LC_{50} 值分别为 9.4、4.1、3.2μg/ml。此外用初提纯的杀马铃薯瓢虫毒性肽对家蚕做了毒力测定，用 10μg/ml 剂量 24 h 致死率为 100%。说明此毒性肽与杀家蚕的成分可能是同源的。

表 6　Tm13-14 纯晶体及初步提纯毒性肽对马铃薯瓢虫毒性

样　　品	LC_{50}(μg/ml)	回 归 式	相关系数 (r)
纯晶体	9.4	$y = 2.886 + 2.169x$	0.989
Sephadex G-75 柱下峰 I	4.1	$y = 3.435 + 2.522x$	0.965
DEAE-纤维素,柱下峰 I	3.2	$y = 3.780 + 2.413x$	0.990

3　讨论

本研究结果表明,对鳞翅目、双翅目和鞘翅目昆虫皆有杀虫活性的 Tm13-14 菌株晶体,经化学降解成原毒素或经昆虫肠道酶消化产物的主要抗酶多肽组成,与仅对鳞翅目和双翅目有活性的 HD-1 晶体有明显差别。前者除含有 HD-1 所具有的多肽成分外，还含有 HD-1 缺少的杀鞘翅目瓢虫的分子量为 69kD 和 65kD 毒肽组分(表 1, 2)。该组分同时兼有杀鳞翅目家蚕活性。这种对两个目昆虫有活性的毒肽成分，可能是一种新的毒素蛋白类型。已有研究报道[12]，根据 B.t. 晶体的寄主范围分组为 4 个病原型：A. 鳞翅目, B. 双翅目，C. 鞘翅目，D. 鳞翅目和双翅目。另据分子遗传学研究[13]，已发现 B.t. 有 14 个不同的主要晶体蛋白基因，按其基因结构和编码蛋白的寄主范围区分为 4 个主要类型，与病原型相一致。代表株 HD-1 晶体为病原型 D,属 Cry[II] 基因型,编码 130kD 和 61/65kD 蛋白，与本实验结果相同。病原型 C 代表株 B.t. subsp. tenebrions 属 Cry[III] 基因型。该晶体在 pH10 溶解产物分析由分子量为 74kD 和 68kD 两种主要多肽组成,仅对鞘翅目叶甲类有毒性[14]。而 Tm13-14 菌株晶体的寄主范围和抗虫肠酶毒肽组成与上述各型均不相同。因此，作者认为 Tm13-14 是一株新的病原型菌株，还可能蕴含有新的晶体蛋白基

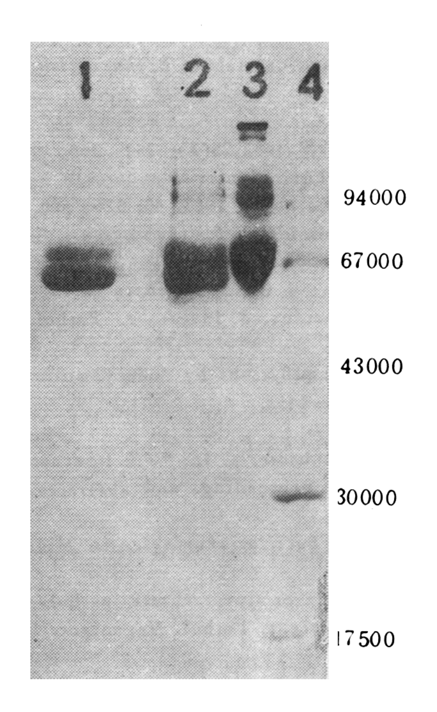


图 6　Tm13-14 晶体经马铃薯瓢虫肠道酶消化后 Sephadex G-75 柱下峰 I 和 DEAE-纤维素柱下峰 I SDS-PAGE 图谱
1. DEAE-纤维素柱下峰 I′; 2. Sephadex G-75 柱下峰 I; 3. 过柱前样品; 4. 标准蛋白。

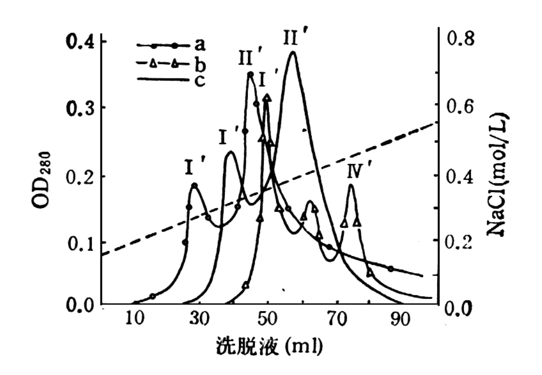


图 7　Sephadex G-100 柱下有毒峰 DEAE-纤维素柱洗脱曲线
a. 家蚕； b. 斜纹夜蛾； c. 马铃薯瓢虫。

因。对于该晶体蛋白编码基因有待进一步的鉴定和分型，从而揭示其广谱杀虫的内在联系提供分子遗传学的基础。

从三种晶体蛋白的抗虫肠酶多肽分析显示，不同品系(病原型)晶体有不同的电泳图谱。表明每种晶体有自己特定的酶作用部位，或者说，一种原毒素能活化成对不同昆虫的毒素有赖于蛋白酶，与先前报道一致[6,13]。因此，通过研究已知杀虫特性晶体与不同目昆虫肠酶作用的主要抗酶多肽图型，从而进一步分子水平上认识和鉴别晶体毒素蛋白结构特性和毒肽组成，对 B.t. 菌株筛选和发现新杀虫菌晶体将有指导意义。

参 考 文 献

1 Goldberg, L. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (H14), strain ONR 60/WHO/CCBC 1897. Proc. calif. Mosquito Vector. Cont. Assoc. 1980, **48**: 28—32.

2 Krieg, A. A., *et al*. A new isolated of B.t. effective against Coleoptera. In: "17th International Congress of Entomology" abstract. Volum. 1984, 748, Hamburg, FRG.

3 罗绍彬，等. 苏芸金杆菌 Tm13-14 菌株的生物学和对昆虫的毒性. 生物防治通报，1991，7(1): 24—26.

4 Pendleton, I. R., R. B. Morrison. Separation of the spores and crystals of *B. thuringiensis*. Nature, 1966, **212**: 728—729.

5 袁玉荪，等. 生物化学实验. 高教出版社，1984.

6 沙槎云，等. 昆虫肠道蛋白酶对苏芸金杆菌晶体作用的比较. 昆虫学报，1982，**25**(3): 244—248.

7 Tojo, A., *et al*. Dissolution and degradation of Bacillus thuringiensis δ-endotoxin by gut juice protease of the silkworm, Bombyx mori. Appl. Environ. Microbiol. 1983, **45**: 576—580.

8 Li, R. S., *et al*. Importance of spores, crystals, and δ-endotoxins *B. thuringiensis* in *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae*. J. Invertebr. Pathol. 1987, **50**: 277—284.

9 Yawetz, A., *et al*. Purification and hydrophobic properties of the δ-endotoxin in the parasporal crystal production by Bacillus thuringiensis Var. entomocidus. J. Invertabr. Pathol. 1983, **42**: 106—112.

10 Weber, K , *et al*. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chemi. 1969, **244**:4406—4412.

11 莽克强. 聚丙烯酰胺凝胶电泳. 北京：科学出版社，1975.

12 Ellar, D. J. Pathogenicity determinants of entompathogenic bacteria. In: "Vth International collogiuum on invertabrate pathology and microbial control", proceedings and abstracts. Adelaide, Australia. 1990, 298—302.

13 Hofte, H., H. R. Whiteley. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Reviews, 1989, **53**:242—253.

14 Gelernter, W., Payne, J. "Fundamental and applied aspects of invertebrate pathology" (R. A. Samon, J. M. Vlak and D. Peters, eds). 4th, Int. Coll. Invertebr. Pothol. Vageniger. 1986, 554—555.

PROTEIN COMPONENTS AND TOXICITY OF DELTA-ENDOTOXIN CRYSTALS FROM *BACILLUS THURINGIENSIS* Tm13-14

Yan Bing　Luo Shaobin　Yan Jianping　Wang Huijie

(*Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica　Wuhan* 430071)

Abstract　The protein components of the delta-endotoxin crystals from *Bacillus thuringiensis* HD-1 (toxic to Lepidoptera), 3370-1 (nontoxic) and Tm13-14 (toxic to Lepidoptera, Diptera, and Coleoptera) were compared under the different lysated condition by SDS-PAGE. The results showed that Tm13-14 crystal contains two major peptides with MW 138 kD, 132 kD and a minor peptides of 65 kD. The components of Tm13-14 crystal protein or its proteinase resistant peptides (PRPs) by gut juice of the three insect species tested are different from those of strain HD-1 and 3370-1.

The toxic PRPs of Tm13-14, resulted from dissolving crystal by gut juice of three insect species, were purified by two steps, first by sephadex G-100 and then by DEAE-52 chromatography. The results of bioassay and SDS-PAGE analysis suggested that the toxic PRPs to the larvae of *Bombyx mori* were 68.5 and 59 kD, to the larvae of *Spodoptera litura* were 71 kD, 65 kD and 59.6 kD, to the larvae of *Epilachna niponica* were 69kD and 65 kD.

The LC_{50} values of intact crystal, the first purified toxic PRPs and 2nd purified toxic PRPs of Tm13-14 to the second instar larvae of *E. niponica* were 9.4, 4.1 and 3.2μg/ml respectively.

Key words　*Becillus thuringiensis* Tm13-14, parasporal crystal, toxic polyptide